

酿酒酵母中胆固醇生物合成与优化的研究进展

李月¹, 庞亚如¹, 成旭¹, 李春^{1,2}, 吕波^{*1}

1 北京理工大学化学与化工学院生物化工研究所, 北京 102488

2 清华大学化学工程系, 北京 100084

李月, 庞亚如, 成旭, 李春, 吕波. 酿酒酵母中胆固醇生物合成与优化的研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4869-4885

Li Yue, Pang Yaru, Cheng Xu, Li Chun, Lü Bo. Biosynthesis and optimization of cholesterol in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4869-4885

摘要: 胆固醇是动物体内积累的主要甾醇化合物, 在维持细胞膜功能、合成甾体激素、生产甾体药物中间体等方面具有重要的生物学意义和医学应用价值。传统动物组织提取胆固醇的方法费时费力并存在严重的环境污染问题, 而甾醇分子结构的复杂程度也限制了其化学全合成。近年来, 人们利用合成生物学方法构建的微生物细胞工厂已成功用于萜类、甾醇类等天然产物的开发与合成。文中综述了胆固醇微生物细胞工厂的研究进展, 包括胆固醇生物合成途径的解析、底盘菌株的选择、异源基因元件的挖掘与优化、相关代谢通路的调控等方面, 并讨论了当前研究面临的问题, 以期能为胆固醇的高效生物合成提供参考。

关键词: 胆固醇; 类固醇激素; 微生物细胞工厂; 合成生物学; 代谢通路调控

Biosynthesis and optimization of cholesterol in *Saccharomyces cerevisiae*

LI Yue¹, PANG Yaru¹, CHENG Xu¹, LI Chun^{1,2}, LÜ Bo^{*1}

1 Institute of Biochemical Engineering, School of Chemistry and Chemical Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 102488, China

2 Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: Cholesterol is a major sterol compounds accumulating in animals, which has important biological significance and medical application value in maintaining cell membrane function, synthesizing steroid hormones, and producing steroid drug intermediates. Traditionally, cholesterol is

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFA0901800)

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901800)

*Corresponding author: E-mail: lv-b@bit.edu.cn

Received: 2022-04-06; Accepted: 2022-06-06; Published online: 2022-07-15

obtained by animal tissue extraction, but the whole process is time-consuming and laborious, accompanied by severe environmental pollution. Due to the complex and delicate structure, steroids are difficult to be produced by chemical total synthesis. Most recently, microbial cell factories constructed by synthetic biology have been successfully applied on the biosynthesis and development of natural products, such as terpenoids and sterols. This paper summarized the research progress on cholesterol microbial cell factories, including characterization of cholesterol biosynthesis pathway, selection of chassis strains, mining and optimization of heterologous gene components, and regulation of metabolic pathway, as well as discussed the problems faced by the current research, hoping to provide references for the effective biosynthesis of cholesterol.

Keywords: cholesterol; steroid hormone; microbial cell factories; synthetic biology; regulation of metabolic pathway

胆固醇(cholesterol, CS), 又称胆甾醇, 是一种含有环戊烷骈多氢菲母核的 27 碳甾体化合物, 分子式为 $C_{27}H_{46}O$ 。在分子结构上, 胆固醇主要有 3 部分: (1) 甾体的核心为 4 个碳环 (A-D); (2) A 环上连有极性羟基; (3) D 环上连有短的非极性碳链(图 1), 4 个反式构象的核心环和 C5-C6 之间的双键有助于保持胆固醇的刚性^[1]。

胆固醇是动物细胞膜的基本组成成分, 占质膜脂类的 20%以上, 与邻近的脂质和蛋白相互作用, 调节细胞膜的流动性和渗透性^[2]; 同时, 胆固醇也是合成胆汁酸、维生素 D_3 及甾体

激素的重要前体, 用于维持机体代谢与正常生理功能^[3]。在工业应用中, 胆固醇作为两性脂质, 常用于脂质体薄膜材料、乳化剂、软膏基质等药用辅料, 有效增强脂质体制剂的流动性与稳定性, 为药物制剂提供良好保障^[4]。胆固醇具有天然甾体母核骨架, 其侧链降解可用于制备多种甾体药物中间体, 如孕烯醇酮^[5]、雄甾-4-烯-3,17-二酮^[6]、薯蓣皂素^[7]等, 甾体药物在消炎、避孕、免疫调节、内分泌紊乱和老年性疾病等方面具有重要临床作用, 已经成为仅次于抗生素的世界第二大类药物^[8]。

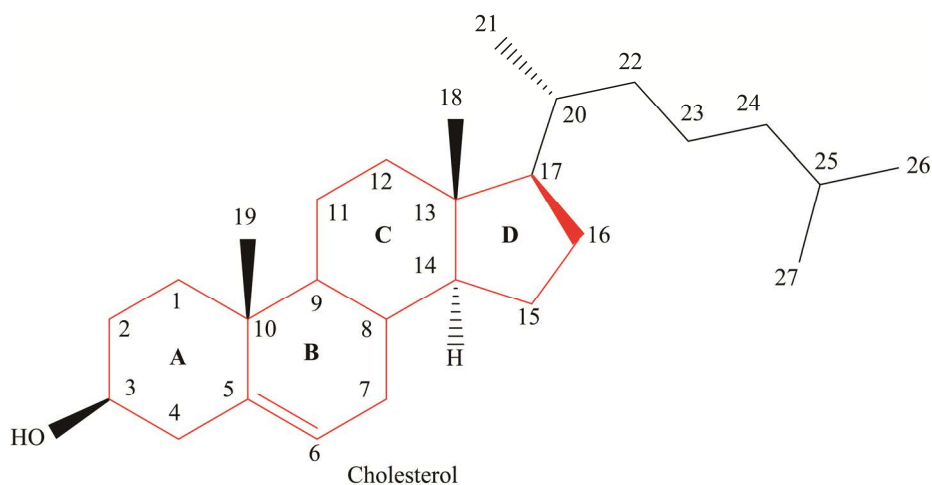


图 1 胆固醇结构示意图 红色部分为甾体母核结构

Figure 1 Chemical structure of cholesterol. The red part is the steroid nucleus structure.

目前, 胆固醇主要的获取方式是从常见动物组织及羊毛脂中提取^[9]。胆固醇广泛存在于动物组织中, 尤其在脑组织和脊髓组织中含量最丰富, 但由于动物疾病(如疯牛病和猪链球菌等)存在传播的风险, 来自动物来源的胆固醇补充剂可能对人类健康构成潜在危害。从羊毛脂中提取胆固醇的方式由于原料来源有限、提取工艺复杂、工艺污染严重等^[10], 无法满足绿色可持续化发展的需求。由于甾体母核结构复杂, 化学法合成胆固醇难以实现从简单原料进行合成、对原料要求高且存在化学试剂污染等问题。

随着合成生物学和代谢工程的发展, 人们基于微生物强大且多样的生化反应网络, 利用现代生物学技术对已有生物系统进行重新设计并构建人工细胞工厂, 以低价值、可再生的资源为原料生产高附加值天然化合物^[11], 在萜类和甾醇类等天然产物的开发与合成中取得了突破性成果, 如 Paddon 等在酿酒酵母中组装了多个不同来源的功能基因模块, 构建了合成 25 g/L 青蒿酸的工程菌株^[12], 是合成生物学的重大成果典范。人们利用合成生物学技术成功实现了甾醇类天然产物的从头生物合成, 如 Szczebara 等在酿酒酵母中合成 11.5 mg/L 氢化可的松^[13]; Zhang 等在解脂耶氏酵母中合成了 78 mg/L 的孕烯醇酮^[14]和 942 mg/L 菜油甾醇^[15]; Qu 等在酿酒酵母中合成了 1 328 mg/L 7-脱氢胆固醇^[16]。与传统方法相比, 生物合成法具有生产周期短、原料价廉可再生、环境友好等优势^[17], 是一种绿色可持续发展的生产模式, 已经实现了多种天然化合物的合成(表 1), 这为胆固醇的生产提供了新的方向。

随着对胆固醇等甾体化合物生物合成机制的深入解析, 利用合成生物学方法构建微生物细胞工厂有望成为胆固醇生产的新型方式, 这也为天然甾醇及其衍生物的生产提供了有价值

的研究方向。本文对胆固醇的生物合成机制、关键基因元件的挖掘及相关代谢通路的调控优化等研究进行总结, 并探讨了微生物合成胆固醇目前面临的挑战, 以期构建胆固醇微生物细胞工厂提供参考。

1 胆固醇的生物合成机制

胆固醇作为异戊二烯衍生的四环三萜脂类, 其合成以萜类骨架合成途径为基础, 以乙酰辅酶 A 为底物, 经过近 30 步的酶促反应并消耗大量能量, 最终合成胆固醇(图 2)^[31]。在动物中, 胆固醇的生物合成发生在几乎所有细胞中, 是一种基本代谢功能调节途径, 其中由羊毛甾醇合酶(lanosterol synthase, LSS)催化 2,3-氧化鲨烯环化形成的羊毛甾醇为胆固醇生物合成的核心前体^[32]。在一些植物(如番茄、马铃薯、硅藻等)中也发现少量胆固醇的存在, 主要用于甾体生物碱和甾体皂苷的合成, 胆固醇的合成主要是通过环阿屯醇合酶(cycloartenol synthase, CAS)催化 2,3-氧化鲨烯生成中间体环阿屯醇进行的^[33]。

1.1 鲨烯合成阶段

底物乙酰辅酶 A 经过甲羟戊酸(mevalonic acid, MVA)途径生成类固醇物质的结构前体异戊烯焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP)和二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP), 其中, 羟甲基戊二酰辅酶 A (3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A, HMG-CoA)还原酶是 MVA 途径的限速酶, 也是降胆固醇药物(如他汀类药物)的靶点^[34]。IPP 和 DMAPP 在法尼基焦磷酸合酶催化下合成法尼基焦磷酸(farnesyl pyrophosphate, FPP), FPP 在角鲨烯合酶的催化下形成角鲨烯(squalene, SQ), SQ 是所有萜类和类固醇的生化前体^[35]。之后, SQ 由鲨烯环氧化酶氧化生成 2,3-氧化鲨烯(2,3-oxidosqualene)^[36]。

表 1 微细胞工厂合成萜类和甾醇类天然产物

Table 1 Terpenoids and steroids biosynthesized in microbial cell factory

化合物	微生物菌株	产物	产量	参考文献
Compounds	Microbial strains	Products	Yield	References
萜类	大肠杆菌	紫杉二烯	1 020 mg/L	[18]
Terpenoids	<i>E. coli</i>	Taxadiene		
		氧化紫杉烷	570 mg/L	[19]
		Oxygenated taxane		
		番茄红素	925 mg/L	[20]
		Lycopene		
		β -胡萝卜素	44.2mg/g-DCW	[21]
		β -carotene		
	酿酒酵母	青蒿酸	25 g/L	[12]
	<i>S. cerevisiae</i>	Artemisinic acid		
		人参皂苷 Rh2	2.25 g/L	[22]
		Ginsenoside Rh2		
		β -香树脂醇	138.8 mg/L	[23]
		β -armyrrin		
		11-氧- β -香树脂醇	108.1 mg/L	[23]
		11-oxo- β -armyrrin		
		甘草次酸	18.9 mg/L	[23]
		Glycyrrhetic acid		
		齐墩果酸	606.9 mg/L	[24]
		Oleanolic acid		
		番茄红素	1.6 g/L	[25]
		Lycopene		
类固醇	酿酒酵母	7-脱氢胆固醇	1328 mg/L	[16]
Steroids	<i>S. cerevisiae</i>	7-dehydrocholesterol		
		胆固醇	158 mg/g-DCW	[26]
		Cholesterol	(184.7 mg/L)	
		β -谷甾醇	2 mg/L	[27]
		β -sitosterol		
		菜油甾醇	916.9 mg/L	[28]
		Campesterol		
		薯蓣皂素	2.03 g/L	[26]
		Diosgenin		
	解脂耶式酵母	7-脱氢胆固醇	27.9 mg/L	[29]
	<i>Y. lipolytica</i>	7-dehydrocholesterol		
		菜油甾醇	942 mg/L	[15]
		Campesterol		
		孕烯醇酮	78 mg/L	[14]
		Pregnenolone		
		氢化可的松	667 mg/(L·d)	[30]
		Hydrocortisone		

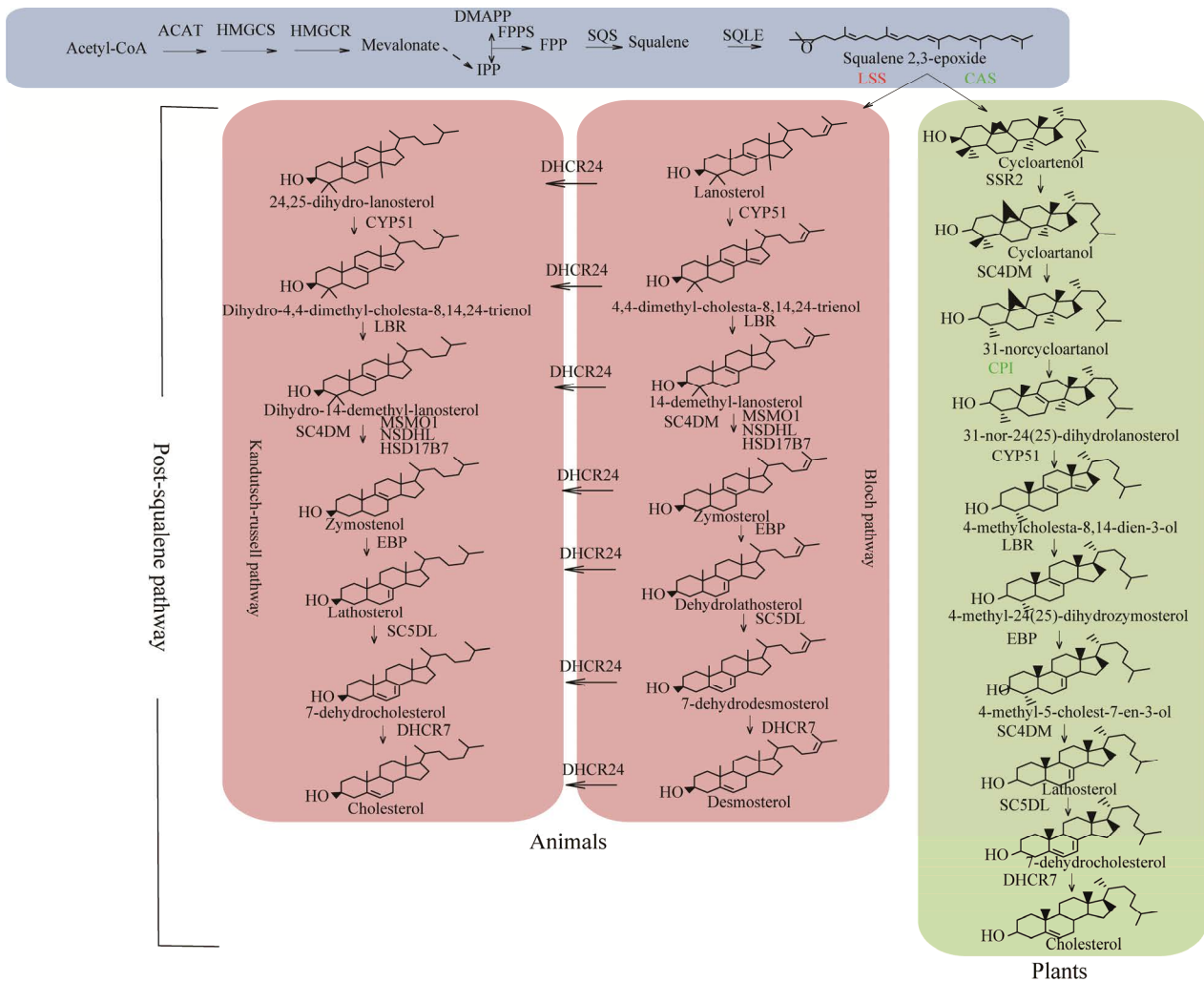


图 2 胆固醇的生物合成途径 ACAT: 乙酰 CoA C-乙酰基转移酶; HMGCS: 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合酶; HMGCR: 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶; FPPS: 法尼基焦磷酸合酶; SQS: 角鲨烯合酶; SQLE: 鲨烯环氧化酶; LSS: 羊毛甾醇合酶; CYP51: 甾醇 C-14 脱甲基酶; LBR: 甾醇 C-14 还原酶; MSMO1: 甲基甾醇单加氧酶 1; NSDHL: 4 α -羧基甾醇-3-脱氢酶; HSD17B7: 3-酮类固醇还原酶; EBP: 甾醇 C-8 异构酶; SC5DL: 甾醇 C-5 还原酶; DHCR24: 甾醇 C-24 还原酶; DHCR7: 7-脱氢胆固醇还原酶; CAS: 环阿屯醇合酶; SSR2: 甾醇侧链还原酶; SC4DM: 甾醇 C-4 脱甲基复合酶; CPI: 环丙基甾醇异构酶。红色区域为动物中胆固醇合成途径, 绿色区域是动物中胆固醇合成途径。红色与绿色标记的酶表示动物、植物中胆固醇合成途径的差异酶

Figure 2 The biosynthetic pathway of cholesterol. ACAT: Acetyl-CoA C-acetyltransferase; HMGCS: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase; HMGCR: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase; FPPS: Farnesyl pyrophosphate synthase; SQS: Squalene synthase; SQLE: Squalene epoxidase; LSS: Lanosterol synthase; CYP51: Sterol 14-demethylase; LBR: Delta(14)-sterol reductase; MSMO1: Methylsterol monooxygenase 1; NSDHL: Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase; HSD17B7: 3-Keto-steroid reductase; EBP: C-8 sterol isomerase; SC5DL: Sterol-C5-desaturase; DHCR24: Delta(24)-sterol reductase; DHCR7: 7-Dehydrocholesterol reductase; CAS: Cycloartenol synthase; SSR2: Sterol side chain reductase 2; SC4DM: Sterol C-4 demethylation complex enzymes; CPI: Cyclopropylsterol isomerase. The cholesterol biosynthesis in animal is highlighted in red and in plants is highlighted in green. The enzymes marked in red and green represent the ones that different in animals and plants.

1.2 羊毛甾醇起始合成胆固醇

在动物中, 2,3-氧化鲨烯在 LSS 作用下环化生成四环化合物羊毛甾醇(lanosterol)^[36], 是胆固醇合成途径中第一个环状甾醇中间体, 羊毛甾醇的合成是形成具有胆甾烷环结构中间体的核心步骤^[37]。在羊毛甾醇起始合成胆固醇的过程中, 由于甾醇 C-24 还原酶(Δ 24-sterol reductase, DHCR24)的广泛底物谱, 羊毛甾醇到胆固醇之间的确切反应顺序尚不清晰, 目前根据 DHCR24 的反应顺序, 羊毛甾醇到胆固醇的合成途径可分为 Bloch 路径(Bloch pathway)和 Kandutsch-Russell 路径(Kandutsch-Russell pathway)两种通路^[38]。

在 Bloch 路径中, 从羊毛甾醇到链甾醇的所有中间体都含有 C-24 位双键: 羊毛甾醇在甾醇 C-14 脱甲基酶作用下, 脱掉 C-14 的甲基并形成双键, 甾醇 C-14 还原酶将双键还原生成 14-去甲基羊毛甾醇(14-demethyl lanosterol), 之后由 C-4 去甲基化酶系统^[39](包含甲基甾醇单加氧酶、4 α -羧基甾醇-3-脱氢酶和 3-酮类固醇还原酶)介导的去甲基化在 C-4 处失去两个甲基生成酵母甾醇(zymosterol); zymosterol 由甾醇 C-8 异构酶催化 C-8 到 C-7 的双键异构化和甾醇 C-5

脱氢酶催化 C-5 (6)发生去饱和化, 生成 7-脱氢链甾醇(7-dehydrodesmosterol), 之后 7-脱氢胆固醇还原酶(7-dehydrocholesterol reductase, DHCR7)将 C-7 双键还原生成链甾醇(desmosterol), DHCR24 将链甾醇 C-24 双键还原最终生成胆固醇^[40]。这一过程需要 9 种催化酶(表 2), 消耗 15 个 NADPH 和 10 个 O₂, 产生 20 多个结构相似的甾醇分子, 在 Kandutsch-Russell 路径中, DHCR24 先作用于羊毛甾醇生成 24,25-二氢羊毛甾醇(24,25-dihydrolanosterol), 这样从 24,25-二氢羊毛甾醇到 7-脱氢胆固醇(7-dehydrocholesterol, 7-DHC)的所有中间体都含有饱和的侧链, Bloch 途径中的任何中间体均能由 DHCR24 转化为其不饱和对应物, 即 Kandutsch-Russell 路径中的化合物, 最终形成胆固醇^[41]。

受 DHCR24 底物杂泛性的影响, 胆固醇合成的最直接途径将取决于特定甾醇底物的酶的特异性, 从而产生动力学上有利的途径。在对 DHCR24 底物特异性的体外研究中发现, 24-dehydrolanosterol 是 DHCR24 最具活性的底物^[42], 这表明胆固醇的合成优先从羊毛甾醇到

表 2 参与胆固醇生物合成的相关酶

Table 2 Enzymes involved in cholesterol biosynthesis

Enzyme/Gene symbol	Enzyme	Enzyme commission number	Cofactor	O ₂
HMGR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	EC 1.1.1.34	NADPH	
SQS	Squalene synthase	EC 2.5.1.21	NAD(P)H	
SQLE	Squalene epoxidase	EC 1.14.14.17	NAD(P)H	O ₂
LSS	Lanosterol synthase	EC 5.4.99.7		
CYP51	Sterol 14-demethylase	EC 1.14.15.36	3NADPH	3O ₂
LBR	Delta(14)-sterol reductase	EC 1.3.1.70	NADPH	
MSMO1	Methylsterol monooxygenase 1	EC 1.14.18.9	3NADH	3O ₂
NSDHL	Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase	EC 1.1.1.170	NAD ⁺	
HSD17B7	3-keto-steroid reductase	EC 1.1.1.270	NADPH	
EBP	C-8 sterol isomerase	EC:5.3.3.5		
SC5DL	Sterol-C5-desaturase	EC 1.14.19.20	NADPH	O ₂
DHCR24	Delta(24)-sterol reductase	EC 1.3.1.72	NAD(P)H	
DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase	EC 1.3.1.21	NAD(P)H	

24-dehydrolathosterol 的 Bloch 分支开始, 然后通过 lathosterol 转移到 Kandutsch-Russell 分支。在这种情况下, 7-DHC 是胆固醇合成途径的最后一种中间体。

1.3 环阿屯醇起始合成胆固醇:

植物中合成胆固醇的特有前体为环阿屯醇(cycloartenol)^[43], 它是一种五环三萜类化合物, 由 CAS 催化 2,3-氧化鲨烯生成^[44]。在植物胆固醇合成过程中, 合成途径从2,3-氧化鲨烯起始共经过 10 步酶反应, 比动物中胆固醇合成途径多出一部特有的酶催化反应: 环丙基甾醇异构酶(cyclopropylsterol isomerase, CPI) 催化 31-norcycloartanol 的 C-9 发生去甲基化反应, 生成 31-nor-24(25)-dihydrolanosterol。

植物中的甾醇侧链还原酶(sterol side chain reductase, SSR)分为两大类: Δ 24-甾醇还原酶(SSR1)和甾醇侧链还原酶 2 (SSR2)^[45]。SSR1 负责催化菜油甾醇和谷甾醇合成的最后一步反应, 而 SSR2 只负责在胆固醇途径中催化环阿屯醇合成 cycloartanol^[46]。甾醇 C-4 脱甲基复合酶(sterol C-4 demethylation complex enzymes, SC4DM)负责催化甾醇中间体的 C-4 去甲基化, 去掉 C-4 位置的两个甲基后中间体才能转化为功能甾醇, SC4DM 包括 4-甲基甾醇氧化酶(sterol methyl oxidase, SMO)、 3β -羟基类固醇脱氢酶(3β -hydroxysteroid dehydrogenase, 3β -HSD)和 3-酮甾醇还原酶(3-keto sterol reductase, 3KSR)。在动物中, 单一 SMO 酶参与两个连续的去甲基化步骤, 而在植物中 SMO3 和 SMO4 分别参与胆固醇前体的第一次和第二次 C-4 脱甲基^[47]。

2 从头合成胆固醇微生物细胞工厂的构建与优化

2.1 从头合成胆固醇的底盘细胞

构建胆固醇微生物细胞工厂需要选择合适

的底盘细胞, 具有成熟操作系统及遗传稳定的底盘细胞是天然产物绿色制造的基础。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)作为基因工程中的模式微生物, 已被广泛应用于天然化合物的生产, 其具有如下优势: (1) 生物安全性高, 生长速度快, 适合大规模发酵; (2) 遗传背景清晰, 基因操作工具成熟^[48], 如基于同源重组与筛选标记的传统基因编辑技术和新型基因编辑技术如锌指核酸酶系统、CRISPR/Cas 相关系统等; (3) 具有真核生物完整的膜体系和蛋白翻译后修饰能力, 有利于锚定内质网膜蛋白的表达^[49]; (4) 酵母中存在天然固醇合成路径, 酿酒酵母是麦角固醇的天然生产者, 麦角甾醇是酵母细胞膜的重要结构和调节成分^[50], 在胆固醇和麦角固醇的生物合成途径中, 二者具有共同的前体酵母甾醇, 而且后续的酶具有相似的催化功能。因此, 易于操作和现有的甾醇合成途径使得酿酒酵母成为理想的甾醇类物质从头合成的底盘细胞。Souza 等^[51]在酿酒酵母 RH2881 中失活甾醇 C24 甲基转移酶(sterol 24-C-methyltransferase, ERG6)和 ERG5, 同时引入斑马鱼来源的 DHCR7 和 DHCR24, 首次构建了稳定合成胆固醇的酿酒酵母工程菌株 RH6829, 其胆固醇产量约为 1 mg/g 细胞湿重, 开发了利用基因工程技术改造麦角固醇的合成途径, 为在酿酒酵母中构建固醇类化合物的细胞工厂提供参考。

随着合成生物学的发展, 在酿酒酵母中合成胆固醇衍生物的研究被持续报道。具有 C-17 孕烷侧链的孕烯醇酮是合成其他甾体药物的重要中间体。Duport 等^[52]在酿酒酵母 FY1679-28C 中失活甾醇 C22 还原酶(C-22 sterol desaturase, ERG5), 同时引入拟南芥源 C7 还原酶(Δ 7-sterol reductase, DHCR7)并表达牛源细胞色素 P450 胆固醇侧链降解酶系统(包括细胞色素酶 P450scc 及其天然的皮质铁氧还蛋白 ADX 和铁

氧还蛋白还原酶 ADR),首次实现了孕烯醇酮的从头合成,产量达到 60 mg/L。甾醇 11 β -羟基化的氢化可的松(hydrocortisone, HS)是一种有效的抗炎药^[53]。Chen 等^[30]在酿酒酵母 BY4742 中引入丝状真菌犁头霉菌(*Absidia Rachis*)来源的甾体 11 β -羟基化系统^[54](包括细胞色素 P450 酶 CYP5311B2 及其相对应的细胞色素 P450 还原酶和细胞色素 b5)合成氢化可的松,产量为 22 mg/(L·d)。含有螺酮结构的薯蓣皂素

(diosgenin)是目前合成甾体激素的关键原料,薯蓣属植物中天然存在着成对 C-16,22-二羟化酶(CYP90G 亚家族)和 C-26 羟化酶(CYP94D 亚家族)的 P450 酶^[7],催化氧化胆固醇 5,6-螺酮化生成薯蓣皂素。Cheng 等^[55]在生产胆固醇的酿酒酵母工程菌株 DG-Cho 中研究了不同物种的类固醇 C-16,22-二羟化酶和 C-26 羟化酶催化能力,发现盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis*) C-16,22-二羟化酶 *DzinCYP90G6* 和山藜芦(*Veratrum*

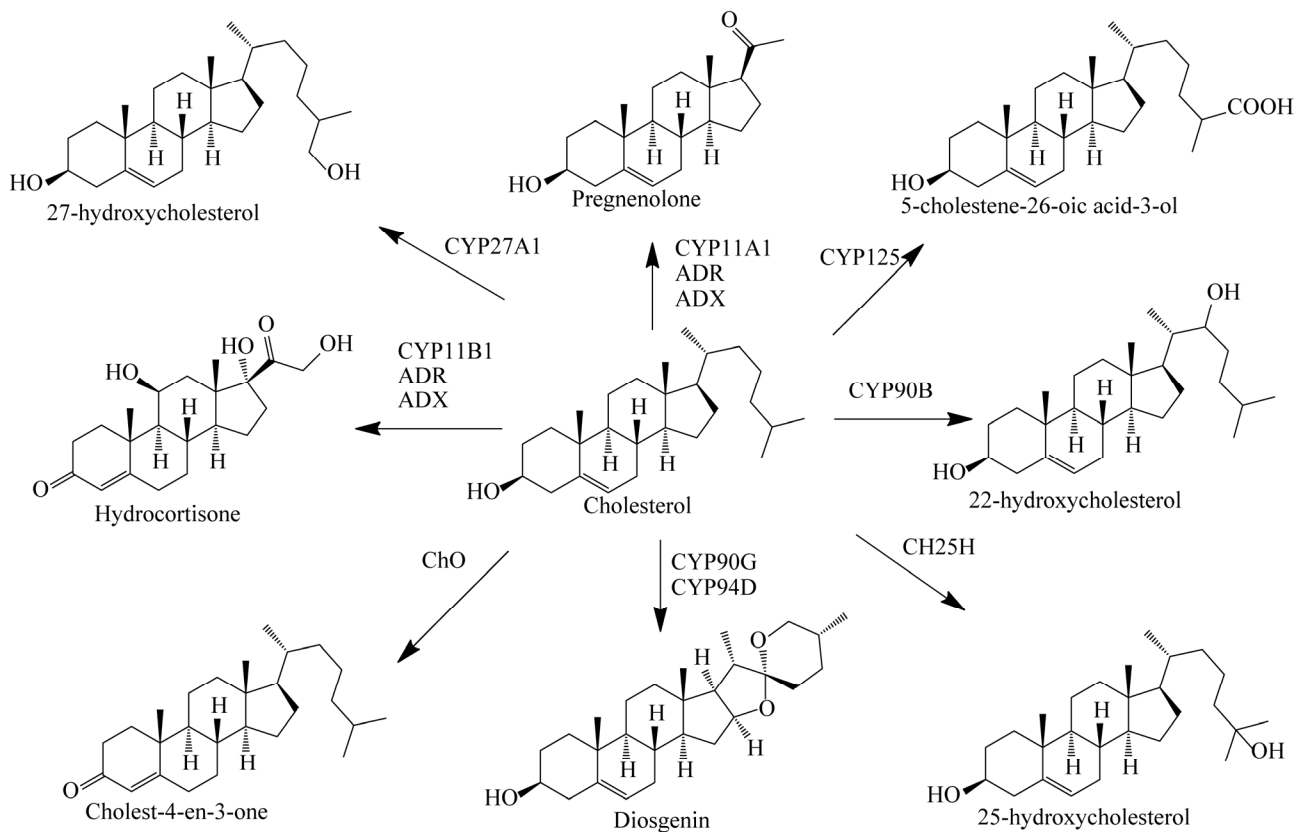


图 3 胆固醇衍生物的合成示意图 CYP11B1: 类固醇 11- β -单加氧酶; ADR: 皮质铁氧还蛋白还原酶; ADX: 皮质铁氧还蛋白; CYP27A1: 胆固醇 26-羟化酶; CYP11A1: 胆固醇侧链裂解酶; CYP125: 甾醇 C-26 单加氧酶; CYP90B: 胆固醇 C-22 羟化酶; CH25H: 胆固醇 25-羟化酶; CYP90G: 类固醇 C-16,22-二羟化酶; CYP94D: 类固醇 C-26 羟化酶; Cho: 胆固醇氧化酶

Figure 3 Biosynthesis of steroids based on cholesterol. CYP11B1: Steroid 11-beta-monooxygenase; ADR: Adrenodoxin reductase; ADX: adrenodoxin; CYP27A1: Cholesterol 26-hydroxylase; CYP11A1: Cholesterol side-chain cleavage enzyme; CYP125: Sterol C-26 monooxygenase; CYP90B27: Cholesterol 22-hydroxylase; CH25H: Cholesterol 25-hydroxylase; CYP90G: Steroid 16,22-dihydroxylases; CYP94D: Steroid 26-hydroxylases; Cho: Cholesterol oxidase.

californicum) C-26 羟化酶 *VcCYP94N1* 的组合表达效果最好, 薯蓣皂素产量达到 10 mg/L。植物来源的胆固醇 22-羟化酶(*CYP90B* 家族)催化胆固醇的 C-22 位发生羟基化反应, 生成 22-羟基胆固醇。Qu 等在构建薯蓣皂素合成途径工作中进一步过表达薯蓣来源的胆固醇 22-羟化酶 *DzinCYP90B71*, 薯蓣皂素的产量提高了 15 倍, 产量达到 (0.45 ± 0.05) mg/(L·*OD*₆₀₀)^[26]。

目前, 利用酿酒酵母从头合成胆固醇及其衍生物已成为有价值的研究热点。随着催化胆固醇的生物酶不断被解析, 如 *UhiA* 等^[56]在耻垢分枝杆菌中发现了胆固醇氧化酶(cholesterol oxidase, *ChO*)催化氧化胆固醇的 C-3 位羟基生成胆甾-4-烯-3-酮(cholest-4-en-3-one), 是胆固醇分解代谢的第一步; *Rostonic* 等^[57]在红球菌(*Rhodococcus jostii*)中挖掘到催化胆固醇 C26 位羟基化的细胞色素 P450 氧化酶 *CYP125*, 负责启动甾醇侧链的降解反应; *Liang* 等^[58]发现人源细胞色素 P450 酶 *CYP27A1* 催化胆固醇 C27 羟基化生成 27-羟基胆固醇(27-hydroxycholesterol); *Galiano* 等^[59]研究发现 C25-羟化酶(cholesterol 25-hydroxylase, *CH25H*)催化胆固醇生成的 25-羟基胆固醇(25-hydroxycholesterol, 25-HC), 是重要的固醇分子之一, 可被细胞用于抵抗细菌和病毒感染。随着降解胆固醇生物酶研究的不断推进, 利用合成生物学将这些修饰酶广泛用于甾体药物生产, 可实现甾醇微生物转化巨大的工业应用价值。

在酿酒酵母中改造内源麦角固醇途径而从头合成异源胆固醇已成为可能, 目前构建高效生产胆固醇的微生物细胞工厂还存在诸多难点, 包括: (1) 在微生物底盘中引入的异源酶存在底物特异性差、催化活性低的问题; (2) 胆固醇合成途径冗长, 宿主内前体和能量供应不足;

(3) 宿主内源固醇合成途径对胆固醇的合成造成竞争与干扰; (4) 异源甾醇大量积累对宿主细胞造成负担, 影响细胞的生长。研究人员通过多种策略来解决上述问题。

2.2 关键酶的挖掘与改造

在酵母中合成胆固醇需要引入两种异源还原酶 *DHCR24* 和 *DHCR7*, 如何提高外源酶与宿主细胞的亲和性是提高胆固醇产量的一个关键因素, 其中从多样性来源中筛选功能酶是一种提高异源酶与底盘菌株适配性的有效策略^[60]。

DHCR24 是依赖于黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, *FAD*)的氧化还原酶^[61], 在胆固醇生物合成过程中催化甾醇中间体 C-24 双键的还原, 其 N 端跨膜结构域引导靶向内质网膜^[62]。*Souza* 等^[51]在功能性失活 *ERG6* 和 *ERG5* 的酵母底盘中验证了人源、斑马鱼和非洲爪蟾 3 种不同来源的 *DHCR24* 用于从头合成胆固醇, 证明了斑马鱼来源 *Dr_DHCR24* 效果最好。*Guo* 等^[63]在原有研究基础上又筛选了脊椎动物、植物和真菌来源的 *DHCR24*, 根据在酿酒酵母中异源合成 7-DHC 的产量进行活性比较; 结果表明, 脊椎动物家鸡来源的 *DHCR24* (*Gg_DHCR24*)具有较高的还原酶活性, 其菌株 7-DHC 产量(64.1 mg/L)达到 *Dr_DHCR24* 菌株的 1.8 倍, 而来自植物、无脊椎动物和真菌的 *DHCR24* 都未在酵母中实现 7-DHC 的积累。

DHCR7 催化甾体母核中 C7-C8 双键的还原, 是一种膜包埋酶, 其活性不依赖于细胞色素 P450 还原酶^[64], 在胆固醇合成途径中催化 7-DHC 形成最终产物胆固醇, 在酵母中筛选适配性高的异源 *DHCR7* 可进一步提高目标甾醇的合成。*DHCR7* 能够催化多种底物, 如催化麦角甾醇-5,7-二烯醇(*Ergosta-5,7-trien-3-ol*)的 C-7 双键还原为菜油甾醇(*campesterol*)。2016 年, *Du* 等建立了非洲爪蟾、水稻和褐家鼠的

DHCR7 全长结构模型,发现含有非洲爪蟾来源 DHCR7 酶的酵母菌株获得了最高效价的菜油甾醇,并根据 DHCR7 结构模型发现,底物上的羟基与 Y278 和 D409 形成了一个有利的氢键网络,从而促使底物与酶的紧密结合,当 Asp 残基突变为 Glu 后,结合亲和力损失 86.7%,证明了 D409 为底物结合关键位点^[65]。据此,Zhang 等对 DHCR7 的来源做了进一步拓展及筛选,使用具有更高活性的斑马鱼来源 DHCR7 (Dr_DHCR7)替换先前的爪蟾 DHCR7,菜油甾醇的产量提升了 432%^[15]。周武林等^[28]基于生物信息学分析,筛选了与 Dr_DHCR7 高度同源的 9 种 DHCR7,其中表达巴丁鱼(*Pangasianodon hypophthalmus*) DHCR7 的酿酒酵母工程菌株比 Dr_DHCR7 的工程菌株菜油甾醇产量提高了 29.2%。Xu 等^[26]选择富含生物碱(甾体类生物碱由胆固醇生物合成,是茄科植物特有的代谢产物)的茄科植物 DHCR7 进行筛选,其中表达马铃薯 DHCR7 (St_DWF5)菌株中菜油甾醇的产量比表达 Dr_DHCR7 菌株高 39%。因此,通过在酵母底盘中筛选合适酶来源并调控其转录水平,可以提高胆固醇的合成效率。

异源表达动物 DHCR24 在微生物中显示出较差的底物特异性,从而限制了目标甾醇的有效生物合成。本课题组系统分析了不同来源的 DHCR24 和 DHCR7 的分子进化树(图 4),并在原始酿酒酵母菌株 BY4742 中表达 DHCR24 后,发现发酵产物中除目标甾醇 7-DHC 外,还存在 24,25-二氢羊毛甾醇、lathosterol 等副产物,结果证明了 DHCR24 确实存在底物杂泛性,能够识别催化酵母中多种固醇中间体,这与 Nes 等的研究成果一致^[41]。因此,通过对关键酶的分子改造来进行理性改造,增强酶识别底物的特异性,是改善胆固醇异源合成的潜在方法。在三萜化合物的合成途径中,Sun 等^[24]通过同源

建模和分子对接方法确定了植物 P450 单加氧酶 CYP72A63 与底物 11-oxo- β -amyrin 疏水相互作用的关键残基(L330、L333、T338 和 A334),并对其进行了分子改造,实现了 94.2%的 C-30 氧化,从而进一步提高了生物合成甘草次酸的产量。

2.3 优化合成胆固醇微生物细胞工厂的策略

在获得胆固醇生物合成的工程菌株后,为了进一步满足后续工业化进程、提高酵母中异源甾醇的合成能力,通过采用代谢工程相关策略对代谢途径进行调控和优化,如阻断或弱化竞争途径、增强甾体合成途径的代谢通量、提高胞内目标产物的存储能力等方法来提高胆固醇的合成产量。

2.3.1 阻断或弱化竞争途径

竞争性通路的缺失或下调已被证明是开发高效细胞工厂的一个成功策略^[66]。酿酒酵母细胞中内源的麦角固醇通路与胆固醇合成途径具有直接共同前体酵母甾醇,存在明显的竞争关系。有研究表明,麦角固醇通过调节胆固醇相关基因的表达,抑制胆固醇吸收和促进胆固醇外排来抑制胆固醇的合成^[67]。因此,敲除或弱化麦角固醇途径不仅可以阻断代谢旁路,还可以消除麦角甾醇对甾醇合成途径的抑制作用,这是构建胆固醇微生物细胞工厂的必需步骤。

在酿酒酵母中,麦角固醇合成途径的关键基因 ERG6 和 ERG5 是常被选择用来操作的对象。ERG6 催化麦角固醇的 C-24 位甲基化,ERG5 通过在甾醇侧链的 C-22 处引入反式双键来催化麦角甾醇合成途径的第 20 步,当 ERG5 或 ERG6 失活后,底物酵母甾醇到麦角甾醇途径的代谢流可以被有效削弱^[68]。另一方面,由于麦角甾醇是酿酒酵母细胞膜的关键成分,在维持细胞膜的流动性、膜结合酶的活性与细胞

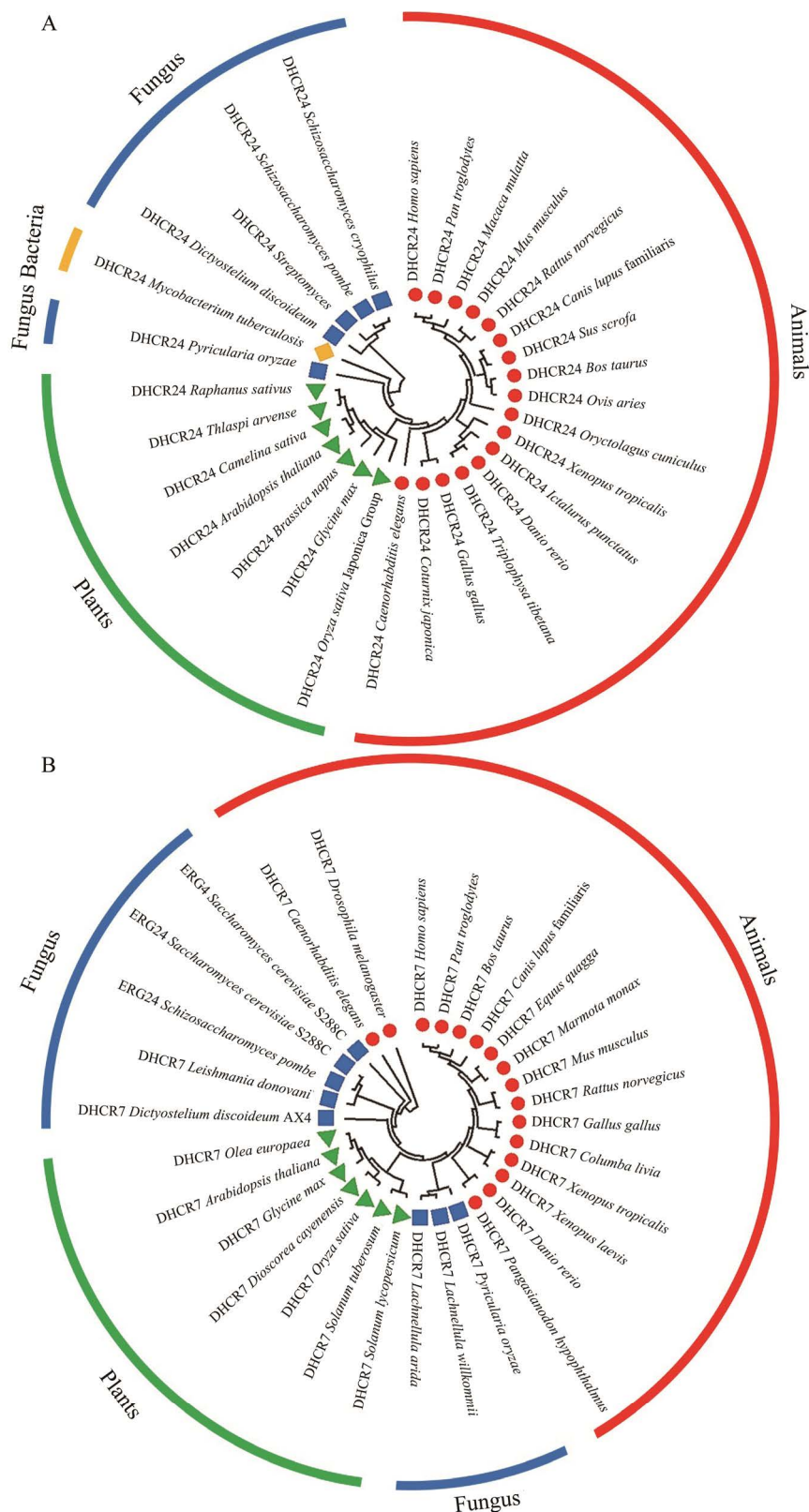


图 4 不同来源 DHCR24 (A)和 DHCR7 (B)的分子进化树

Figure 4 The Molecular phylogenetic tree of different DHCR24 (A) and DHCR7 (B).

的物质运输等方面起着重要作用, 麦角固醇代谢途径的阻断导致了代谢失衡、低生长和有毒中间代谢物的积累等一系列问题。Su 等验证 *ERG5* 的缺失导致细胞内游离 NADH/NAD^+ 比值升高, 甘油和乙醇积累增多, 从而导致细胞内氧化还原失衡, 进而影响目标产物的合成^[69]。为了优化代谢通量的分布, 同时避免直接敲除竞争途径基因产生的一系列问题, 调控启动子或实现基因诱导型表达是重要手段。Qu 等^[16]采用聚类规则间隔短回文重复干扰系统(*clustered regularly interspaced short palindromic repeats interference, CRISPRi*), 通过靶向 *ERG6* 启动子进行动态抑制 *ERG6* 的表达量, 与直接失活 *ERG6* 相比, 动态调控 *ERG6* 使得菌株 OD_{600} 值提高了 43%, 7-DHC 产量提高了 64%。Xu 等^[26]采用弱 *ERG7* 启动子和低浓度葡萄糖抑制型 *HXT1* 启动子调控 *ERG6* 的表达, 相较于 *ERG6* 敲除的对照菌株, 胆固醇积累量分别提高了 15 倍和 5.5 倍。因此, 以酿酒酵母为底盘构建胆固醇微生物细胞工厂, 麦角固醇竞争途径的敲除或弱化是首要考虑的因素, 消除内源竞争性抑制, 有助于构建稳定合成胆固醇的工程菌株。

2.3.2 增强甾体合成途径的代谢通量

微生物合成胆固醇的产率低的主要原因是代谢途径过长和代谢不平衡, 因此可对合成途径进行调控来增强甾体合成的代谢通量。为了保证充足的前体供给, 增加 MVA 模块关键基因的拷贝数来增加代谢通量, Hassan 等^[70]通过在酿酒酵母 *INVSc1* 中过表达 *IDII* 和 *ERG20*, 增强 MVA 途径中的乙酰辅酶 A 通量, 长叶烯 (*longifolene*) 产量从 1.22 mg/L 提高到 2.35 mg/L, 提高了 1.9 倍; 过表达 *tHMG1* 增强了角鲨烯的积累, 长叶烯产量达到了 14 mg/L, 提高了 1.32 倍。Westfall 等^[71]对酿酒酵母 *CEN.PK2* 中 MVA 通路中所有功能基因进行过表达, 利用半乳糖调

节的 *GAL1* 启动子或 *GAL10* 启动子增加 *ERG10*、*ERG13*、*tHMG1*、*ERG12*、*ERG8*、*ERG19*、*IDII* 和 *ERG20* 基因的拷贝数, 提高 MVA 途径的代谢通量, 青蒿酸 (*artemisinic acid*) 的产量增加一倍, 达到 50.7 mg/(L· OD_{600})。在增强前体底物池的基础上, 采用“推-拉”策略, 调节后鲨烯途径中的相关基因, 促进鲨烯下游代谢通量, 积累目标产物, 如张文倩等对合成 7-DHC 菌株中后鲨烯路径进行调控, 其中联合过表达 *ERG2* 和 *ERG3* 基因模块及过表达 *ERG11* 能够有效拉动鲨烯向酵母甾醇的积累, 提高 7-DHC 的产量^[72]。Guo 等^[63]采用活性更强的启动子 *GAL1* (P_{GAL1}) 代替 *DHCR24* 原启动子 P_{GAL7} , 7-DHC 产量由 78.4 mg/L 提高到 81.7 mg/L。除了增加拷贝数或提高启动子强度外, 还可以对蛋白空间位置进行优化。内质网是胆固醇生物合成的场所, 特别是鲨烯下游固醇合成途径的阶段, 所有酶都定位在内质网上, 并与膜结合, 而甾醇分子的底物和产物往往是极端疏水性的, 这增加了内质网膜蛋白催化和传递固醇中间体的难度。Guo 等采用途径区域化重组来调节代谢流量, 将鲨烯下游途径酶重新安排亚细胞位置, 将 *ERG* 蛋白与异源蛋白靶向到脂质体, 加速中间代谢物的传递^[73]。除了内质网酶的分区重构, 利用内质网形态改造策略容纳更多膜蛋白, 有助于提高胆固醇的生产能力。例如, 酵母磷脂生物合成调控基因 *INO2* 在扩大内质网空间方面起着关键作用^[74]。Qu 等^[16]在酿酒酵母 *CEN.PK2-1C* 中过表达磷脂生物合成调控基因 *INO2*, 扩大了内质网空间, 使角鲨烯和 7-DHC 产量分别提高了 1.07 倍和 1.68 倍。Dusséaux 等^[75]在酿酒酵母 *EGY48* 过氧化物酶体中引入了一个完整的甲羟戊酸途径, 乙酰辅酶 A 转化柠檬烯 (*limonene*) 的效率大幅度提高, 产量达到 141 mg/L, 将整个柠檬烯合成途径从细胞质转移到过氧化物酶

体, 实现了比胞质生产最多 125 倍的增长。

2.3.3 细胞器改造提高甾醇的存储能力

酵母细胞中甾醇的合成与分布受系统严格调控, 甾醇在胞内以游离甾醇和甾醇酯两种形式存在, 过量甾醇的合成会引发产物抑制效应, 脂滴(lipids, LDs)作为酵母细胞中甾醇等亲脂性化合物的储存单元, 对甾醇存储细胞器脂滴的改造及提高脂质含量, 是改善胆固醇等亲脂性产物在酵母中积累的有效方法。Qian 等^[76]在脂质合成能力不同的解脂耶氏酵母中改造麦角固醇合成途径, 通过敲除 *ERG5* 并过表达 *DHCR7* 构建了菜油甾醇合成途径, 发现菜籽油甾醇主要存在于脂滴中, 并验证了脂质含量与菜油甾醇合成的关系, 在敲除多功能 β -氧化蛋白(multifunctional β -oxidation protein, MFE1)的工程解脂耶氏酵母 YL-D⁺M⁻E⁻ 中, 其脂肪酸的消耗减少、脂质含量增加, 细胞脂滴含量提高了 59%, 菜油甾醇产量提高了 1.6 倍。在以往的研究中, 过表达二酰基甘油酰基转移酶(diacylglycerol O-acyltransferase, DGA1)有效提高酿酒酵母细胞的脂滴含量^[77]。本课题组^[78]过表达 DGA1, 显著增加了胞内的脂滴积累, 扩大了疏水性萜烯 α -香树脂醇(α -amyrin)的存储池。少数脂滴(few lipid droplet)基因 1 (*FLDI*)是人类 seipin 的功能同源物, 可调节酵母中脂滴的大小, 在缺失 *FLDI* 基因的菌株中, 随着脂滴增大, 固醇储存量上调了 70%^[79]。酵母 *FLDI* 基因的功能失常会导致 LDs 聚集或在紧靠核膜的附近产生超大型 LDs^[80]。Ma 等^[81]敲除重组酵母细胞 *FLDI* 基因, 亲脂性产物番茄红素的积累量提高了 25%。酵母内源存在两种固醇酰基转移酶 ARE1 和 ARE2^[82], 它们将游离甾醇转化为中性固醇酯, ARE1 和 ARE2 缺失后甾醇酯的水平明显降低。固醇酯与三酰甘

油是脂滴的组成成分, 对 ARE1 和 ARE2 过表达来强化甾醇酯化过程, 从而提高脂滴含量, 为增强酵母中甾醇的存储能力提供参考。

3 讨论与展望

胆固醇等天然甾体化合物具有复杂的甾体结构, 是制备甾体药物中间体的重要前体, 目前胆固醇的化学合成困难且污染严重, 而天然提取方式存在不容忽视的环境污染问题。随着合成生物学技术的不断发展, 构建微生物细胞工厂异源合成胆固醇等天然甾醇化合物有望替代传统方法, 实现成本低廉、绿色环保、安全无毒的甾体化合物的制备, 为甾体激素类药物的生产提供了新的路线。

胆固醇生物合成路线长、调控复杂, 目前微生物从头合成胆固醇仍处于初始发展阶段, 构建高效生产胆固醇的微生物细胞工厂还需解决几个问题: (1) 途径异源酶表达活性低, 底物特异性差; (2) 宿主内源固醇合成途径的竞争与干扰; (3) 异源甾醇对宿主细胞造成负担, 难以大量积累。随着人们对甾醇调控机制的深入探索, 以及合成生物学技术的不断发展, 采用酶工程策略对异源酶进行改造, 实现酶高效异源表达; 提出宿主内源甾醇与目标甾醇的稳态协同调控策略, 如增加甾醇存储空间, 实现宿主稳定生长和高效生产; 通过开发或改造获得潜在的优良宿主是改善甾醇积累造成细胞负担的有效手段。同时, 随着自然界中降解胆固醇等甾醇化合物的基因簇不断被挖掘, 利用合成生物学技术在微生物中合成相关甾体衍生物, 通过提出更有效的异源合成甾醇的策略, 突破甾体合成瓶颈, 争取早日实现甾体化合物的绿色工业制造。

REFERENCES

- [1] Li LH, Dutkiewicz EP, Huang YC, Zhou HB, Hsu CC. Analytical methods for cholesterol quantification[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2019, 27(2): 375-386
- [2] Khondker A, Hub JS, Rheinstädter MC. Steroid-steroid interactions in biological membranes: cholesterol and cortisone[J]. Chemistry and Physics of Lipids, 2019, 221: 193-197
- [3] Subczynski WK, Pasenkiewicz-Gierula M, Widomska J, Mainali L, Raguz M. High cholesterol/low cholesterol: effects in biological membranes: a review[J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 2017, 75(3/4): 369-385
- [4] Briuglia ML, Rotella C, McFarlane A, Lamprou DA. Influence of cholesterol on liposome stability and on *in vitro* drug release[J]. Drug Delivery and Translational Research, 2015, 5(3): 231-242
- [5] Hartz P, Strohmaier SJ, EL-Gayar BM, Abdulmughni A, Hutter MC, Hannemann F, Gillam EMJ, Bernhardt R. Resurrection and characterization of ancestral CYP11A1 enzymes[J]. The FEBS Journal, 2021, 288(22): 6510-6527
- [6] Rohman A, Dijkstra BW. The role and mechanism of microbial 3-ketosteroid Δ^1 -dehydrogenases in steroid breakdown[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2019, 191: 105366
- [7] Christ B, Xu CC, Xu ML, Li FS, Wada N, Mitchell AJ, Han XL, Wen ML, Fujita M, Weng JK. Repeated evolution of cytochrome P450-mediated spiroketal steroid biosynthesis in plants[J]. Nature Communications, 2019, 10: 3206
- [8] 贾红晨, 李芳, 郑鑫铃, 崔慧林, 骆健美, 申雁冰, 王敏, 田妥, 丁安鹏. 甾体微生物转化反应关键酶 3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(7): 2218-2235
- Jia HC, Li F, Zheng XL, Cui HL, Luo JM, Shen YB, Wang M, Tian T, Ding AP. Research progress of 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase, a key enzyme for steroid microbial conversion[J]. Microbiology China, 2020, 47(7): 2218-2235 (in Chinese)
- [9] Ding H, Zhao D, Gao YJ. Response surface optimization of cholesterol extraction from lanolin alcohol by selective solvent crystallization[J]. Chemical Papers, 2017, 71(1): 71-79
- [10] Pei HR, Ma XT, Pan Y, Han T, Lu ZF, Wu RJ, Cao XL, Zheng JM. Separation and purification of lanosterol, dihydrolanosterol, and cholesterol from lanolin by high-performance counter-current chromatography dual-mode elution method[J]. Journal of Separation Science, 2019, 42(12): 2171-2178
- [11] Xu XH, Liu YF, Du GC, Ledesma-Amaro R, Liu L. Microbial chassis development for natural product biosynthesis[J]. Trends in Biotechnology, 2020, 38(7): 779-796
- [12] Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, Benjamin K, Fisher K, McPhee D, Leavell MD, Tai A, Main A, Eng D, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin[J]. Nature, 2013, 496(7446): 528-532
- [13] Szczebara FM, Chandelier C, Villeret C, Masurel A, Bourot S, Duport C, Blanchard S, Groisillier A, Testet E, Costaglioli P, et al. Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast[J]. Nature Biotechnology, 2003, 21(2): 143-149
- [14] Zhang RS, Zhang Y, Wang Y, Yao MD, Zhang JL, Liu H, Zhou X, Xiao WH, Yuan YJ. Pregnenolone overproduction in *Yarrowia lipolytica* by integrative components pairing of the cytochrome P450scc system[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(12): 2666-2678
- [15] Zhang Y, Wang Y, Yao MD, Liu H, Zhou X, Xiao WH, Yuan YJ. Improved campesterol production in engineered *Yarrowia lipolytica* strains[J]. Biotechnology Letters, 2017, 39(7): 1033-1039
- [16] Qu LS, Xiu X, Sun GY, Zhang CY, Yang HQ, Liu YF, Li JH, Du GC, Lv XQ, Liu L. Engineered yeast for efficient de novo synthesis of 7-dehydrocholesterol[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2022, 119(5): 1278-1289
- [17] Cameron DE, Bashor CJ, Collins JJ. A brief history of synthetic biology[J]. Nature Reviews Microbiology, 2014, 12(5): 381-390
- [18] Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KEJ, Wang Y, Simeon F, Leonard E, Mucha O, Phon TH, Pfeifer B, Stephanopoulos G. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*[J]. Science, 2010, 330(6000): 70-74
- [19] Biggs BW, Lim CG, Sagliani K, Shankar S, Stephanopoulos G, De Mey M, Ajikumar PK. Overcoming heterologous protein interdependency to optimize P450-mediated Taxol precursor synthesis in *Escherichia coli*[J]. PNAS, 2016, 113(12): 3209-3214
- [20] Xu JL, Xu X, Xu Q, Zhang ZD, Jiang L, Huang H. Efficient production of lycopene by engineered *E. coli* strains harboring different types of plasmids[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2018, 41(4): 489-499

- [21] Wu T, Ye LJ, Zhao DD, Li SW, Li QY, Zhang BL, Bi CH, Zhang XL. Membrane engineering - A novel strategy to enhance the production and accumulation of β -carotene in *Escherichia coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 43: 85-91
- [22] Wang PP, Wei W, Ye W, Li XD, Zhao WF, Yang CS, Li CJ, Yan X, Zhou ZH. Synthesizing ginsenoside Rh2 in *Saccharomyces cerevisiae* cell factory at high-efficiency[J]. *Cell Discovery*, 2019, 5: 5
- [23] Zhu M, Wang CX, Sun WT, Zhou AQ, Wang Y, Zhang GL, Zhou XH, Huo YX, Li C. Boosting 11-oxo- β -amyrin and glycyrrhetic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* via pairing novel oxidation and reduction system from legume plants[J]. *Metabolic Engineering*, 2018, 45: 43-50
- [24] Sun WT, Xue HJ, Liu H, Lv B, Yu Y, Wang Y, Huang ML, Li C. Controlling chemo- and regioselectivity of a plant P450 in yeast cell toward rare licorice triterpenoid biosynthesis[J]. *ACS Catalysis*, 2020, 10(7): 4253-4260
- [25] Xie WP, Lv XM, Ye LD, Zhou PP, Yu HW. Construction of lycopene-overproducing *Saccharomyces cerevisiae* by combining directed evolution and metabolic engineering[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 30: 69-78
- [26] Xu LP, Wang D, Chen J, Li B, Li QY, Liu PP, Qin Y, Dai ZB, Fan FY, Zhang XL. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for gram-scale diosgenin production[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 70: 115-128
- [27] Xu SH, Chen C, Li YR. Engineering of phytosterol-producing yeast platforms for functional reconstitution of downstream biosynthetic pathways[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(11): 3157-3170
- [28] 周武林, 高惠芳, 吴玉玲, 张显, 徐美娟, 杨套伟, 邵明龙, 饶志明. 重组酿酒酵母生物合成菜油甾醇[J]. *化工学报*, 2021, 72(8): 4314-4324
Zhou WL, Gao HF, Wu YL, Zhang X, Xu MJ, Yang TW, Shao ML, Rao ZM. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for biosynthesis of campesterol[J]. *CIESC Journal*, 2021, 72(8): 4314-4324 (in Chinese)
- [29] 苏皖, 刘悦, 周晓, 王颖. 生物合成7-脱氢胆甾醇酵母底盘的初探[J]. *化学工业与工程*, 2017, 34(4): 83-90
Su W, Liu Y, Zhou X, Wang Y. The exploration of yeast chassis for 7-dehydrocholesterol biosynthesis[J]. *Chemical Industry and Engineering*, 2017, 34(4): 83-90 (in Chinese)
- [30] Chen J, Fan FY, Qu G, Tang JL, Xi YY, Bi CH, Sun ZT, Zhang XL. Identification of *Absidia orchidis* steroid 11 β -hydroxylation system and its application in engineering *Saccharomyces cerevisiae* for one-step biotransformation to produce hydrocortisone[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 57: 31-42
- [31] Luo J, Yang HY, Song BL. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2020, 21(4): 225-245
- [32] Hubler Z, Friedrich RM, Sax JL, Allimuthu D, Gao F, Rivera-León AM, Pleshinger MJ, Bederman I, Adams DJ. Modulation of lanosterol synthase drives 24, 25-epoxysterol synthesis and oligodendrocyte formation[J]. *Cell Chemical Biology*, 2021, 28(6): 866-875
- [33] Shinozaki J, Nakene T, Takano A. Squalene cyclases and cycloartenol synthases from *Polystichum polyblepharum* and six allied ferns[J]. *Molecules: Basel, Switzerland*, 2018, 23(8): 1843
- [34] Yu DB, Liao JK. Emerging views of statin pleiotropy and cholesterol lowering[J]. *Cardiovascular Research*, 2021, 118(2): 413-423
- [35] Gohil N, Bhattacharjee G, Khambhati K, Braddick D, Singh V. Engineering strategies in microorganisms for the enhanced production of squalene: Advances, challenges and opportunities[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2019, 7: 50
- [36] Zhang TT, Yuan DW, Xie J, Lei YX, Li JG, Fang GQ, Tian L, Liu JC, Cui YY, Zhang M, et al. Evolution of the cholesterol biosynthesis pathway in animals[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2019, 36(11): 2548-2556
- [37] Olkkonen VM, Gylling H, Ikonen E. Plant sterols, cholesterol precursors and oxysterols: minute concentrations—major physiological effects[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 169: 4-9
- [38] Cerqueira NMFSA, Oliveira EF, Gesto DS, Santos-Martins D, Moreira C, Moorthy HN, Ramos MJ, Fernandes PA. Cholesterol biosynthesis: a mechanistic overview[J]. *Biochemistry*, 2016, 55(39): 5483-5506
- [39] Hu D, Gao YH, Yao XS, Gao H. Recent advances in dissecting the demethylation reactions in natural product biosynthesis[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2020, 59: 47-53
- [40] Genaro-Mattos TC, Anderson A, Allen LB, Korade Z, Mimics K. Cholesterol biosynthesis and uptake in developing neurons[J]. *ACS Chemical Neuroscience*, 2019, 10(8): 3671-3681
- [41] Nes WD. Biosynthesis of cholesterol and other sterols[J]. *Chemical Reviews*, 2011, 111(10): 6423-6451
- [42] Ačimovič J, Rozman D. Steroidal triterpenes of cholesterol synthesis[J]. *Molecules: Basel, Switzerland*,

- 2013, 18(4): 4002-4017
- [43] Jaramillo-Madrid AC, Ashworth J, Fabris M, Ralph PJ. The unique sterol biosynthesis pathway of three model diatoms consists of a conserved core and diversified endpoints[J]. *Algal Research*, 2020, 48: 101902
- [44] Pollier J, Vancaester E, Kuzhiumparambil U, Vickers CE, Vandepoele K, Goossens A, Fabris M. A widespread alternative squalene epoxidase participates in eukaryote steroid biosynthesis[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(2): 226-233
- [45] Knoch E, Sugawara S, Mori T, Poulsen C, Fukushima A, Harholt J, Fujimoto Y, Umemoto N, Saito K. Third DWF₁ paralog in Solanaceae, sterol Δ 24-isomerase, branches withanolide biosynthesis from the general phytosterol pathway[J]. *PNAS*, 2018, 115(34): E8096-E8103
- [46] Sawai S, Ohyama K, Yasumoto S, Seki H, Sakuma T, Yamamoto T, Takebayashi Y, Kojima M, Sakakibara H, Aoki T, et al. Sterol side chain reductase 2 is a key enzyme in the biosynthesis of cholesterol, the common precursor of toxic steroidal glycoalkaloids in potato[J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(9): 3763-3774
- [47] Du YL, Fu XZ, Chu YY, Wu PW, Liu Y, Ma LL, Tian HQ, Zhu BZ. Biosynthesis and the roles of plant sterols in development and stress responses[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(4): 2332
- [48] Alexander WG. A history of genome editing in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Yeast*, 2018, 35(5): 355-360
- [49] Davy AM, Kildegaard HF, Andersen MR. Cell factory engineering[J]. *Cell Systems*, 2017, 4(3): 262-275
- [50] Xu SH, Li YR. Yeast as a promising heterologous host for steroid bioproduction[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2020, 47(9/10): 829-843
- [51] Souza CM, Schwabe TME, Pichler H, Ploier B, Leitner E, Guan XL, Wenk MR, Riezman I, Riezman H. A stable yeast strain efficiently producing cholesterol instead of ergosterol is functional for tryptophan uptake, but not weak organic acid resistance[J]. *Metabolic Engineering*, 2011, 13(5): 555-569
- [52] Duport C, Spagnoli R, Degryse E, Pompon D. Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast[J]. *Nature Biotechnology*, 1998, 16(2): 186-189
- [53] Costa S, Zappaterra F, Summa D, Semeraro B, Fantin G. Δ 1-dehydrogenation and C20 reduction of cortisone and hydrocortisone catalyzed by *Rhodococcus* strains[J]. *Molecules*, 2020, 25(9): 2192
- [54] Herráiz I. Chemical pathways of corticosteroids, industrial synthesis from sapogenins[J]. *Methods in Molecular Biology: Clifton, N J*, 2017, 1645: 15-27
- [55] Cheng J, Chen J, Liu XN, Li XC, Zhang WX, Dai ZB, Lu LN, Zhou X, Cai J, Zhang XL, et al. The origin and evolution of the diosgenin biosynthetic pathway in yam[J]. *Plant Communications*, 2021, 2(1): 100079
- [56] Uhiá I, Galán B, Morales V, García JL. Initial step in the catabolism of cholesterol by *Mycobacterium smegmatis* Mc2155[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(4): 943-959
- [57] Rosłonec KZ, Wilbrink MH, Capyk JK, Mohn WW, Ostendorf M, van der Geize R, Dijkhuizen L, Eltis LD. Cytochrome P450 125 (CYP125) catalyses C26-hydroxylation to initiate sterol side-chain degradation in *Rhodococcus jostii* RHA1[J]. *Molecular Microbiology*, 2009, 74(5): 1031-1043
- [58] Liang ZJ, Chen YB, Wang LP, Li D, Yang XC, Ma GF, Wang YH, Li YX, Zhao H, Liang Y, et al. CYP27A1 inhibits bladder cancer cells proliferation by regulating cholesterol homeostasis[J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(1): 34-45
- [59] Galiano V, Villalain J. Aggregation of 25-hydroxycholesterol in a complex biomembrane. Differences with cholesterol[J]. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA - Biomembranes*, 2020, 1862(11): 183413
- [60] Chen Y, Xiao WH, Wang Y, Liu H, Li X, Yuan YJ. Lycopene overproduction in *Saccharomyces cerevisiae* through combining pathway engineering with host engineering[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 113
- [61] Zerenturk EJ, Sharpe LJ, Ikonen E, Brown AJ. Desmosterol and DHCR24: unexpected new directions for a terminal step in cholesterol synthesis[J]. *Progress in Lipid Research*, 2013, 52(4): 666-680
- [62] Quan XP, Chen XQ, Sun DL, Xu B, Zhao LL, Shi XQ, Liu HS, Gao B, Lu XL. The mechanism of the effect of U18666a on blocking the activity of β 3-hydroxysterol Δ -24-reductase (DHCR24): molecular dynamics simulation study and free energy analysis[J]. *Journal of Molecular Modeling*, 2016, 22(2): 46
- [63] Guo XJ, Xiao WH, Wang Y, Yao MD, Zeng BX, Liu H, Zhao GR, Yuan YJ. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for 7-dehydrocholesterol overproduction[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11(7): 192
- [64] Zou L, Li L, Porter TD. 7-Dehydrocholesterol reductase activity is independent of cytochrome P450 reductase[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular*

- Biology, 2011, 127(3/4/5): 435-438
- [65] Du HX, Xiao WH, Wang Y, Zhou X, Zhang Y, Liu D, Yuan YJ. Engineering *Yarrowia lipolytica* for campesterol overproduction[J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0146773
- [66] Pickens LB, Tang Y, Chooi YH. Metabolic engineering for the production of natural products[J]. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, 2011, 2: 211-236
- [67] He WS, Cui DD, Li LL, Tong LT, Rui JX, Li H, Zhang HJ, Liu XQ. Cholesterol-reducing effect of ergosterol is modulated via inhibition of cholesterol absorption and promotion of cholesterol excretion[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 57: 488-496
- [68] Ma BX, Ke X, Tang XL, Zheng RC, Zheng YG. Rate-limiting steps in the *Saccharomyces cerevisiae* ergosterol pathway: towards improved ergosta-5, 7-Dien-3 β -ol accumulation by metabolic engineering[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2018, 34(4): 55
- [69] Su W, Xiao WH, Wang Y, Liu D, Zhou X, Yuan YJ. Alleviating redox imbalance enhances 7-dehydrocholesterol production in engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0130840
- [70] Hassan JU, Kaleem I, Rasool A, Xu K, Adnan Tahir R, Lv B, Li C. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* for the *de novo* synthesis of the aroma compound longifolene[J]. Chemical Engineering Science, 2020, 226: 115799
- [71] Westfall PJ, Pitera DJ, Lenihan JR, Eng DA, Woolard FX, Regentin R, Horning T, Tsuruta H, Melis DJ, Owens A, et al. Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin[J]. PNAS, 2012, 109(3): E111-E118
- [72] 张文倩, 周晓, 肖文海, 王颖. 人工酵母后鲨烯路径基因对 7-脱氢胆固醇合成的影响[J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(6): 39-50
- Zhang WQ, Zhou X, Xiao WH, Wang Y. Effect of post-squalene genes on the synthesis of 7-dehydrocholesterol in the artificial *Saccharomyces cerevisiae*[J]. China Biotechnology, 2016, 36(6): 39-50 (in Chinese)
- [73] Guo XJ, Yao MD, Xiao WH, Wang Y, Zhao GR, Yuan YJ. Compartmentalized reconstitution of post-squalene pathway for 7-dehydrocholesterol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 663973
- [74] Zhang CZ, Hong K. Production of terpenoids by synthetic biology approaches[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 347
- [75] Dusséaux S, Wajn WT, Liu YX, Ignea C, Kampranis SC. Transforming yeast peroxisomes into microfactories for the efficient production of high-value isoprenoids[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(50): 31789-31799
- [76] Qian YD, Tan SY, Dong GR, Niu YJ, Hu CY, Meng YH. Increased campesterol synthesis by improving lipid content in engineered *Yarrowia lipolytica*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(16): 7165-7175
- [77] Polburee P, Ohashi T, Tsai YY, Sumyai T, Lertwattanasakul N, Limtong S, Fujiyama K. Molecular cloning and overexpression of DGA1, an acyl-CoA-dependent diacylglycerol acyltransferase, in the oleaginous yeast *Rhodospiridiobolus fluvialis* DMKU-RK253[J]. Microbiology: Reading, England, 2018, 164(1): 1-10
- [78] Yu Y, Rasool A, Liu HR, Lv B, Chang PC, Song H, Wang Y, Li C. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for high yield production of α -amyrin via synergistic remodeling of α -amyrin synthase and expanding the storage pool[J]. Metabolic Engineering, 2020, 62: 72-83
- [79] Su WC, Lin YH, Pagac M, Wang CW. Seipin negatively regulates sphingolipid production at the ER-LD contact site[J]. The Journal of Cell Biology, 2019, 218(11): 3663-3680
- [80] Wolinski H, Hofbauer HF, Hellauer K, Cristobal-Sarramian A, Kolb D, Radulovic M, Knittelfelder OL, Rechberger GN, Kohlwein SD. Seipin is involved in the regulation of phosphatidic acid metabolism at a subdomain of the nuclear envelope in yeast[J]. Biochimica et Biophysica Acta: BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2015, 1851(11): 1450-1464
- [81] Ma T, Shi B, Ye ZL, Li XW, Liu M, Chen Y, Xia J, Nielsen J, Deng ZX, Liu TG. Lipid engineering combined with systematic metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-yield production of lycopene[J]. Metabolic Engineering, 2019, 52: 134-142
- [82] Yang H, Bard M, Bruner DA, Gleeson A, Deckelbaum RJ, Aljinovic G, Pohl TM, Rothstein R, Sturley SL. Sterol esterification in yeast: a two-gene process[J]. Science, 1996, 272(5266): 1353-1356